



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo de Fin de Grado

Encapsulación seminal: mejora de los protocolos de
inseminación artificial en la especie canina

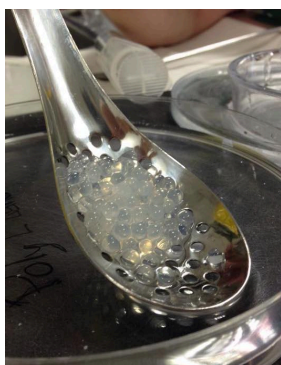
Autora:

Mar Moré i Rafel

Directoras:

Dra. Lydia Gil Huerta

Dra. Noelia González Ortí



Facultad de Veterinaria

2015

1. Resumen/Abstract	2
2. Introducción	4
2.1 Antecedentes	5
2.1.1 Características seminales en la especie canina	5
2.1.2 Sistemas de preservación seminal en la especie canina: convencionales	6
2.1.2.1 Refrigeración seminal	6
2.1.2.2 Congelación seminal	7
2.1.3 Sistemas de preservación seminal en la especie canina: encapsulación	8
2.1.3.1. Antecedentes	8
2.1.3.2. Materiales y técnica	11
2.1.3.3. Ventajas de la encapsulación	12
3. Objetivos	13
4. Material y método	13
4.1 Materiales	13
4.1.1. Material biológico	13
4.1.2. Material laboratorio	13
4.2 Método	14
4.2.1. Preparación de los medios	14
4.2.2. Extracción seminal	15
4.2.3. Obtención de mezcla heterospermica y mezcla con los diferentes alginatos	16
4.2.4. Encapsulado seminal	16
4.2.5. Valoración y clasificación cápsulas	17
5. Diseño experimental	18
5.1. Puesta a punto del experimental	19
5.2. Descripción del protocolo del segundo experimental	19
5.3. Protocolo del experimental definitivo	20
6. Resultados	21
6.1. Puesta a punto previa	21
6.2. Resultados del segundo experimental	22
6.3. Resultados del experimental definitivo	24
6.4. Discusión	25
7. Conclusiones/Conclusions	26
8. Valoración personal	27
9. Referencias bibliográficas	28
ANEXO I: Productos químicos utilizados en el experimental	31
ANEXO II: Imágenes de los distintos experimentales	32

1.- RESUMEN

La encapsulación es una técnica basada en rodear y proteger un núcleo de celular vivas con una membrana semipermeable, que puede estar compuesta por diferentes polímeros, como por ejemplo el alginato de sodio, polímero biodegradable.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la concentración ideal del alginato sódico (0,5, 0,75, 1 y 1,5 %) para la formación de las capsulas como vehículo de espermatozoides en la especie canina, siendo un método de preservación orientado a la inseminación artificial.

Estas concentraciones de alginato sódico se disolvieron según las diferentes experiencias en PBS (Phosphate buffered saline), SS (solución salina) y tres diluyentes seminales: Andromed, Canipro y Fracción 1 del diluyente de Fiser.

Preparados los alginatos, y previo lavado del semen (dilución con Canipro 1:2 y centrifugación a 500 g durante 5 minutos), se añadieron al mismo. Las cápsulas se hicieron con una jeringuilla de insulina, y siguiendo el protocolo de encapsulación se pasaron por cloruro cálcico, Poly-L-lisina y citrato sódico. Se almacenaron en PBS, SS, Canipro, Andromed o en medio Fiser según el protocolo seguido en cada experiencia, a 4°C. Se evaluaron a las 24 horas, directamente y tras una incubación a 37°C. En ambos casos se valoró tanto la conformación de las cápsulas como su resistencia, así como la viabilidad de los espermatozoides en ellas contenidos.

Los resultados obtenidos muestran que el medio que presenta las mejores valoraciones tanto de conformación como de resistencia es la Fracción I del diluyente de Fiser al que se le añade un 1 % de alginato sódico. Para mantener la viabilidad seminal, se debe mantener las capsulas ó esferas en el mismo medio, por estar complementado con un crioprotector, como es el huevo ó la huevina que les protege de las temperaturas de refrigeración.

ABSTRACT

Encapsulation is a technique based on surrounding and protecting a core of living cells with a semipermeable membrane, which may be composed of different polymers such as sodium alginate, a biodegradable polymer.

The aim of this study was to determine the ideal concentration of sodium alginate (0.5, 0.75, 1 and 1.5%) to form the capsules as a vehicle for sperm in dogs, being a method of preservation oriented to artificial insemination.

These concentrations of sodium alginate were dissolved by different experiences in PBS (phosphate buffered saline), SS (saline) and three seminal extenders: Andromed, Canipro and diluent Fraction 1 Fiser.

Alginates were prepared, and after sperm washing (Canipro dilution 1: 2 and centrifugation at 500 g for 5 minutes) thereto was added. The capsules were made with an insulin syringe and

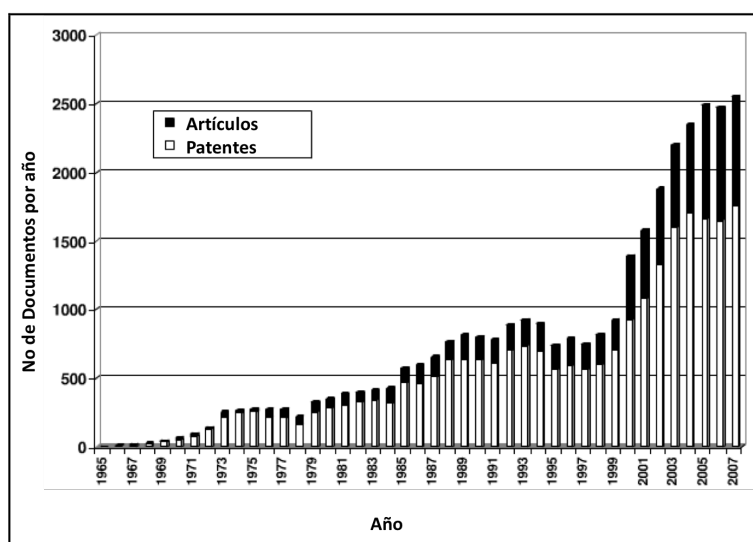
following encapsulation protocol underwent calcium chloride, poly-L-lysine and sodium citrate. They were stored in PBS, SS, Canipro, Andromed or medium Fiser according to protocol in every experience, at 4 °C. They were evaluated at 24 hours, both directly and after being incubated at 37 °C. In both cases, the formation of the capsules and their endurance as well as the viability of the sperm contained in them was evaluated.

The results show that the medium having the best reviews both conformation and resistance is the Fraction I Fiser diluent which is added a 1% sodium alginate. To maintain seminal viability, keep the capsules or spheres in the same medium, to be supplemented with a cryoprotectant, such as egg or egg substitute that protects them from refrigeration temperatures.

2.- INTRODUCCIÓN

La creciente utilización de biotecnologías reproductivas en medicina veterinaria, ha hecho necesaria una constante revisión y perfeccionamiento de los diversos métodos y técnicas utilizadas. La inseminación artificial (IA) es utilizada prácticamente en todos los sectores pecuarios. En los últimos años, se está empezando a incorporar en este ámbito la técnica de encapsulación para la conservación de semen. Ésta consiste en el recubrimiento de células espermáticas con una membrana polimérica semipermeable (Rathore *et al.*, 2013). La primera referencia que se tiene de esta técnica es del 1933 (Vincenzo Bisceglie), pero no es hasta el 1964 cuando Chang, mediante un estudio basado en células sanguíneas, hace la primera publicación al respecto. Después de más de cuatro décadas, numerosos estudios basados en la encapsulación siguen llevándose a cabo en distintas disciplinas.

Esta tecnología ha tenido un crecimiento importante, aumentando cada vez el número de patentes y la publicación de artículos científicos, derivados de la investigación básica y aplicada (Boh, y col., 2008; Gouin, 2004).



Gráfica 1: Número de publicaciones al año relacionadas con la encapsulación (Boh y col. 2008)

Centrándonos en las biotecnologías reproductivas, tenemos la inseminación artificial, que es una técnica que a su vez implica otras, como son la recogida seminal, la preservación seminal y el depósito del semen en el lugar adecuado del tracto de la hembra.

La microencapsulación espermática podría ser una técnica innovadora y alternativa para la preservación de espermatozoides, ayudando a una inseminación artificial exitosa, especialmente en aquellas hembras en las que por su fisiología, los celos son largos o no siempre se presentan de la misma manera, como ocurre en la especie canina, donde la

ovulación de los ovocitos tiene lugar durante un periodo de tiempo prolongado (Johnston, 2001), ya que desde las cápsulas los espermatozoides se van liberando lentamente.

Mediante esta liberación controlada se alcanzan mayores concentraciones de espermatozoides (Ghidoni *et al.*, 2008) y mayor adhesión endometrial. De esta forma se otorga tiempo para una óptima maduración espermática, prolongando el período de fertilización competitiva, característica de gran relevancia para poder aumentar la fertilidad en estas hembras con estros prolongados o de difícil detección (perra). Además, se evitarían los desplazamientos retrógrados y la fagocitosis de los espermatozoides por los macrófagos (Weber *et al.*, 2006).

2.1.- Antecedentes

La inseminación artificial en la especie canina permite que un macho y una hembra se crucen a pesar de que vivan en lugares diferentes, o de que muestren incapacidades motoras, inexperiencia, carácter agresivo u otras situaciones que imposibiliten la monta natural. Pero es necesario tener presente que la perra se caracteriza por tener unas ovulaciones más largas, respecto a otras especies domésticas y además no ovula ovocitos listos para ser fecundados, sino que requieren de un tiempo para completar su maduración y ser fecundables. Este hecho hace que se deba plantear más de una inseminación y por tanto a tener que conservar los gametos masculinos durante un periodo de tiempo más prolongado. La opción más práctica, en muchos casos, es conservar varias extracciones seminales del macho elegido, tras realizar una contrastación de la muestra que confirme que serán capaces de soportar las diluciones y el procesado (Feldman y Nelson, 2007).

2.1.1 Características seminales en la especie canina

El eyaculado del perro está formado por tres fases. Los parámetros seminales a evaluar son: volumen, color, pH, motilidad espermática y progresividad del movimiento, concentración, morfoanomalias, y estado de las membranas espermáticas y acrosomal.

Se resumen los resultados considerados normales en la siguiente tabla (Concannon, 2006):

Parámetro	Valores normales	Parámetro	Valores normales
Primera fracción	0'5 – 5 ml, color transparente	Total de espermatozoides por eyaculado	300 – 2000 x 10 ⁶
Segunda fracción	1 – 4 ml, opalescente	Motilidad progresiva (% del total de espermatozoides)	> 70%
Tercera fracción	1 – 80 ml, transparente	Morfología normal (% del total de espermatozoides)	> 80%
Volumen total del eyaculado	2'5 - 80 ml	pH	6'3 – 6'7
Concentración espermática	4 – 400 x 10 ⁶ /ml	Leucocitos por campo de mayor aumento en muestra centrifugada	0 – 3, en la primera fracción 0 – 3, en la segunda fracción 0 – 6, en eyaculado total

2.1.2 Sistemas de preservación seminal en la especie canina: Convencionales

Actualmente, los sistemas más usados para la conservación seminal son la refrigeración y la congelación. Los dos sistemas, se basan en disminuir las tasas metabólicas del espermatozoide y prolongar su longevidad (Watson, 1995). Aún así, lamentablemente los espermatozoides sufren daños durante su almacenamiento, afectando en parte a su capacidad fecundante (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Para evitar ciertos daños, se usan diluyentes, cuya función reside en proteger a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolaridad (Marshall 1990).

2.1.2.1 REFRIGERACIÓN SEMINAL

En caso de que el mantenimiento seminal no vaya a superar los 5 días, se recomienda la conservación a 5°C. El quinto día tras la recogida y habiendo mantenido el semen refrigerado, las características de dicho semen son equivalentes a las del semen congelado (England y Ponzio, 1996). En caso de tener que mantener el semen por más de cinco días, la mejor manera de preservarlo es mediante la congelación.

Antes de la refrigeración, el semen debe ser sometido a un protocolo de preparación, centrifugándose para la eliminación del plasma seminal y siendo diluido posteriormente con un diluyente de refrigeración. La dilución óptima no está definida, yendo desde 1:1 (Root, 2005a) hasta 1:5 (Peña y cols. 2006), considerando la primera parte semen y la segunda el diluyente

Los diluyentes, están constituidos principalmente por un disolvente que es el agua pura bidestilada en la que están disueltos distintos componentes: azúcares simples y sales que actúan como fuente de energía (Álamo, 2007), componentes iónicos y no iónicos que mantienen la osmolaridad y el pH, o estabilizadores de membrana que protegen frente al choque térmico.

Como factor de protección térmico (crioprotector), se trabaja con la yema de huevo, aunque hay otros elementos que también podrían ser utilizados con este fin, como son las proteínas de la leche o la albúmina sérica bovina (Stornelli y cols., 2006).

Para reducir al máximo el impacto que supone el cambio de temperatura y hacerlo de forma paulatina el semen no se introduce directamente a 5°C, si no que se aconseja sumergir el semen diluido y envasado en un recipiente con agua a temperatura ambiente, y todo ello introducirlo a 5°C, de esta manera la bajada se hará de manera más gradual (Feldman y Nelson, 2007).

2.1.2.2 CONGELACIÓN SEMINAL

Para la conservación a más largo plazo, se recomienda la congelación. Los valores mínimos de la contrastación para considerar apto al semen de cara a la congelación serán más estrictos que en el caso de la refrigeración, puesto que es una técnica más agresiva para el semen, por tanto éste debe ser de mejor calidad.

La mayor ventaja de este método de preservación, es que ofrece la posibilidad de la creación de un banco de genes, puesto que la conservación de las muestras es indefinida. No obstante, el inconveniente es que a día de hoy aún si los procedimientos de congelación-descongelación, así como de la cantidad y tipo de diluyentes utilizados, están estandarizados, los resultados no son tan buenos como en otras especies. Posiblemente esto sea debido en parte a la variabilidad individual y al grado de sensibilidad de los espermatozoides y la respuesta celular inconstante (Petrunkina y cols., 2005). Si a esto le sumamos que es necesario dejar el semen directamente en útero con lo que ello implica, nos encontramos con que los resultados todavía no son tan óptimos como en otras especies.

La congelación lleva implícito el uso de crioprotectores, siendo el glicerol y el DMSO los que más se usan en la especie canina (Silva y cols., 2006), en una proporción de hasta el 8%. Los crioprotectores se añaden después de la centrifugación, proceso necesario para que los espermatozoides se conserven correctamente, puesto que es necesario la eliminación del plasma seminal. Tras este paso, y realizada la dilución con los diluyentes que ya incorporan los crioprotectores, se pasa al periodo de equilibrado, que consta de un intervalo entre 60-75 minutos en que el semen estará a 4-5°C, para empezar a adaptarse a los cambios producidos,

evitando así en la mayor medida los posibles daños. Transcurrido el periodo de equilibrado se pasa a la congelación propiamente dicha, que llevará las muestras a -196°C , temperatura que detiene cualquier actividad y reacción bioquímica que podría producir la muerte del espermatozoide. Podemos congelar en pajuelas de 0'5 ó 0'25 ml; siendo más práctico el uso de pajuelas que el de pastillas, ya sea por su identificación como por el manejo.

En cada caso debemos tener en consideración el protocolo establecido para la descongelación, momento determinante para la posterior viabilidad de la muestra.

2.1.3 Sistemas de preservación seminal en la especie canina: Encapsulación

Se puede definir la encapsulación como el proceso de recubrir partículas sólidas, gotas de líquido o gases, protegiéndolas contra factores ambientales perjudiciales (Barbosa, 2000).

En términos reproductivos, los espermatozoides (fase interna o centro activo) son los que deben recubrirse por una membrana semipermeable (cápsula o pared), dando lugar a la creación de partículas semisólidas. La cápsula permitirá el paso de moléculas de bajo peso, mientras que el de las macromoléculas se verá restringido. Esta característica es importante, ya que significa que los compuestos bioquímicos del medio de conservación seguirán siendo útiles para mantener la estructura y la funcionalidad del espermatozoide.

2.1.3.1 ANTECEDENTES

Se han realizado varios experimentos en el ámbito de la veterinaria (Tabla 1):

- *Porcino*: Quizás la especie en la que más se ha investigado.

Las pruebas que se han realizado *in vitro*, han mostrado que no existen diferencias significativas en los parámetros seminales analizados durante la conservación del semen refrigerado a 15°C . Además el sistema que se ha diseñado, permite una liberación lenta y secuenciada de las células espermáticas de la matriz de la capsula, a temperaturas de 38°C .

En las pruebas *in vivo*, se observó que había una mayor concentración de espermatozoides en el lugar de fecundación del aparato genital en aquellas cerdas inseminadas con una única inseminación de semen encapsulado, respecto a cerdas a las que se les aplicaron dos dosis de semen no encapsulado (**Imagen 1**).

Otras granjas efectuaron dos inseminaciones/estro, tanto con semen encapsulado como no encapsulado. Se obtuvo un mayor tamaño de camada de lechones en aquellas cerdas inseminadas con semen encapsulado (Sánchez-Sánchez, 2014).

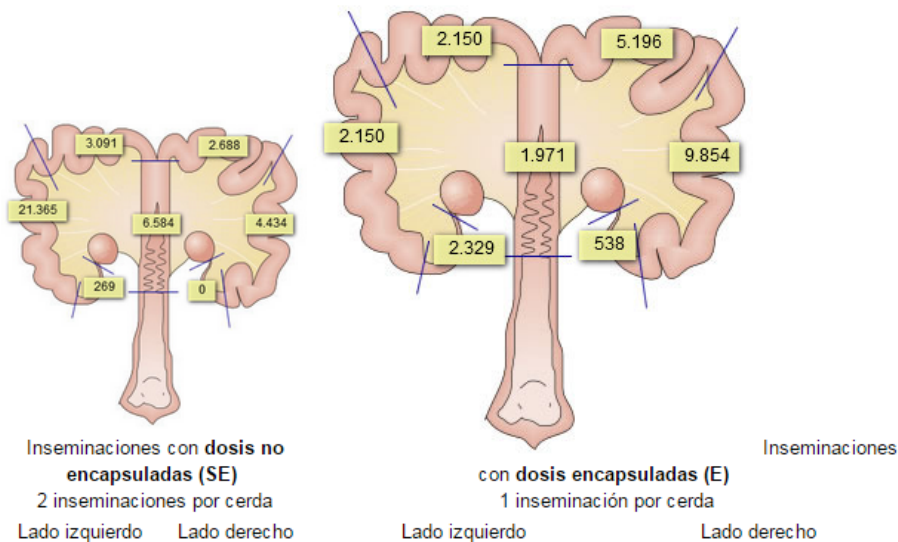


Imagen 1: Resultados obtenidos en conservación seminal, transporte espermático y pruebas de inseminación. (Sánchez-Sánchez, R. (2014).

- **Vacuno:** En 1993 Nebel y cols. realizaron las primeras experiencias de microencapsulación con semen bovino y tuvieron resultados exitosos, puesto que fueron capaces de mantener concentraciones de semen altas y que fueron liberándose en un período de tiempo largo, mientras duraba el celo de las hembras.

En vacuno se ha trabajado con otro material altamente demandado en microencapsulados de semen bovino, son los liposomas, unos lípidos que se adicionan al medio de conservación. Estos proporcionan una elevada crioestabilidad dada por la interacción entre las regiones cargadas de los grupos fosfatidilglicerol de estos y las membranas espermáticas, coexistiendo un intercambio de colesterol y lípidos entre ambos (Röpke et al., 2011).

- **Canino:** En la especie canina, se han realizado pocos estudios y en la mayor parte de ellos no concluyeron con éxito (Shah *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2010).

En los estudios desarrollados, se confirmó que no hubo diferencias significativas a nivel de la motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma entre los espermatozoides encapsulados y aquellos que no lo estaban. Sin embargo, se demuestra que si previo a la encapsulación los espermatozoides son expuestos a glicerol durante 30-60 minutos, los valores de los parámetros valorados son superiores frente a los que no han sido expuestos, aunque durante la primera media hora eran iguales o inferiores. La concentración utilizada de alginato para

realizar las cápsulas y que estas tengan una forma esférica y que posteriormente se disuelvan lentamente en esta experiencia fue del 1%.

- **Roedores:** Los estudios se han centrado en el uso de la encapsulación de cara a la maduración de ovocitos para el uso en las técnicas de reproducción asistida. Kreeger *et al*, en 2005 consiguió madurar ovocitos en las distintas etapas, gracias al co-cultivo tridimensional que ofrecían los microencapsulados de ovocitos y células del cúmulo enriqueciendo el medio con FSH.

Aplicaciones en reproducción			
Autor	Tipo de micropartícula	Material activo	Uso
Röpke y cols. 2011	Liposomas	Espermatozoides	Estabilidad espermática/ bovino
Shah y cols. 2010	Micropartículas de alginato y poli-L-lisina	Espermatozoides	Mantenimiento y motilidad/ Roedores, canino
Guidoni y cols. 2008	Micropartículas	Espermatozoides	Conservación semen/ porcino, bovino, ovino, canino, humana
Weber y cols. 2006	Micropartículas	Espermatozoides	Aumento fertilidad/ bovino
Kreeger y cols. 2005	Micropartículas	ovocitos	Mantenimiento y maduración/ roedores
Krentz y cols. 1993	Micropartículas	Embriones	Cultivo y obtención/ roedores

Tabla 1: Antecedentes de los estudios de encapsulación en las diferentes especies. (Valenzuela, 2013).

- **Humana:** En las últimas cinco décadas, la calidad de los espermatozoides y la concentración de éstos tanto en hombres fértiles como en infértiles ha disminuido. Se hace por consiguiente crucial que los modos de preservación sean óptimos.

La encapsulación también se ha aplicado a los ovocitos humanos, obteniendo mejores rendimientos de maduración en comparación con métodos de rutina: 90,3 % vs. 52 %, respectivamente, después de 48 h de cultivo. (Torre *et al*. 2006).

El uso de polímeros naturales en el área biomédica ha sido empleado durante las últimas décadas en diferentes aplicaciones:

- **Farmacología:** para el desarrollo de la formulación de micropartículas como un nuevo sistema de entrega de fármacos, agentes encapsulantes de drogas, células, tejidos y/o diversas biomoléculas, el uso de las cápsulas aumentaría la biodisponibilidad del compuesto encapsulado, mejorando la capacidad de carga y retrasando la erosión de las partículas en el medioambiente gastrointestinal. De esta manera se disminuye, en muchos casos, la frecuencia de administración de fármacos. Sería una opción por ejemplo, para la administración de

proteínas por vía oral, puesto que mejora de manera sustancial su estabilidad y por consiguiente, su biodisponibilidad. (Sato y cols. 2011).

Además, ha sido también utilizada en el campo de la oncología, usando la diferencia de pH de las células tumorales. También en la creación de vacunas, debido a la probada capacidad inmuno-estimulante (Neira-Carrillo, 2013) y en cosmética.

- **Alimentación:**

En esta disciplina la encapsulación aporta ventajas como la de proteger el compuesto activo de la degradación, controlar la liberación de tal compuesto, modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipulación, así como separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen (López-Córdoba, 2012), modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo o enmascarar sabores desagradables, entre otros.

Según un estudio de Hinestroza-Córdoba (2008) la encapsulación en alginato de sodio es la técnica que más se ha usado en la industria para garantizar la viabilidad de las bacterias probióticas y de ácido láctico que se han incorporado a alimentos funcionales, debido a su bajo costo y sencillez en su proceso de preparación.

2.1.3.2 MATERIALES Y TÉCNICA

La composición de la cápsula consta de alginatos e iones polivalentes, que en un principio se encuentran disueltos en soluciones acuosas.

Los alginatos son polisacáridos lineales constituidos por dos unidades monoméricas, el ácido b-D-manurónico (M) y el ácido a-L-gulurónico (G), que se extraen de las algas marinas pardas como: *Laminaria hyoerborean*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pirifera* (Neira.Carrillo *et al*, 2013). Estos tienen propiedades para formar geles y soluciones altamente viscosas (Hernández *et al*, 2012). El alginato en solución precipita con una solución de cloruro cálcico (CaCl_2) para obtener fibras insolubles. Estas fibras se tratan con HCl para obtener el ácido algínico y finalmente se neutralizan con carbonato de sodio Na_2CO_3 para obtener alginato de sodio.

La propiedad más útil y única de los alginatos (que son de carga negativa) es su habilidad para reaccionar con cationes metálicos polivalentes (de carga positiva). El calcio es el ión divalente de mayor empleo en la formación de geles de alginato debido a que sus sales son económicas, de fácil disponibilidad y no tóxicas. Para obtener un gel de características apropiadas, los iones calcio deben ser liberados lentamente en la solución del alginato; lo cual se logra empleando una sal de calcio de baja solubilidad. La conformación de la red

tridimensional resultante asociación cooperativa entre los bloques M y G, será la de tipo “caja de huevos”.

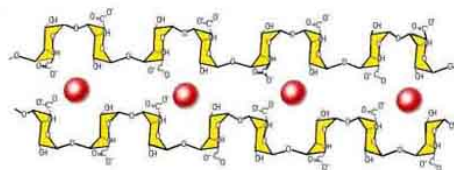


Imagen 2: Conformación del alginato tipo “caja de huevos”, lograda por la asociación con iones Ca^{+2} . *Bioquímica de los alimentos Calvo (2012).*

Eligiendo cuidadosamente los materiales utilizados para la encapsulación inicial y el posterior recubrimiento, se puede controlar la velocidad de degradación de la cápsula. (Schlameus, 1992). Hay estudios que afirman que si se busca una biodegradación lenta, es recomendable el uso de Poly-L-lisina. Éste es un polímero sintético aniónico que además ayuda a mejorar la estabilidad química y mecánica (Desai, 1995).

En general, la elaboración de las microcápsulas con fines de conservación de semen y mantenimiento de la viabilidad y motilidad progresiva de los espermatozoides basada en la utilización de alginato de sodio al 1% y Poli-L-lisina como material de recubrimiento, resultan ser la composición que ha logrado mejores resultados (Shah *et al.*, 2010).

En cuanto a las técnicas disponibles para la encapsulación de materiales activos, podríamos mencionar métodos físicos: coextrusión, secado por aspersión, disco rotatorio, lecho fluido; y fisicoquímicos: polimerización *in situ*, precipitación, evaporación del solvente, polimerización interfacial, coacervación simple y compleja, atrapamiento en liposomas y gelación iónica (Gouin, 2004; Zuidam y Heinrich, 2009). La selección del proceso de encapsulación para una aplicación determinada dependerá del tamaño de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo de producción.

El tamaño de las cápsulas es modificable. Según Chan *et al.* (2009) algunas de las variables a tener en cuenta son: densidad (ρ), tensión superficial (γ) y viscosidad (η) de la solución hidrocoloide, diámetro de la punta de goteo (dT), distancia de recolección (h), velocidad de caída (u), diámetro de la gota (dd), entre otras.

2.1.3.3 VENTAJAS DE LA ENCAPSULACIÓN

Todos los trabajos relacionados con esta técnica, aunque son pocos, coinciden en que este método es el futuro de la inseminación artificial debido a todas las ventajas que aporta.

- La propiedad más representativa de la encapsulación, que además proporciona un enorme beneficio respecto a otros sistemas, se basa en la liberación de oleadas de espermatozoides, abarcando un intervalo periovulatorio mayor.
- Otra ventaja reside en la posibilidad de conservar las cápsulas a temperaturas de refrigeración para evitar la proliferación de microorganismos y retrasar la capacitación de los espermatozoides, sin necesidad de congelarlas.
- La concentración de espermatozoides se define en el momento de formar la cápsula; ésta se mantiene gracias a que el diluyente otorga nutrientes para garantizar tanto la estructura como la viabilidad de los espermatozoides (Lim y Sun, 1980).
- El hecho de que estén rodeados por la pared, les confiere protección frente luz, pH, humedad, entre otros.
- El uso de alginatos provoca que cuando las cápsulas se disuelven en el aparato genital de las hembras, tengan una viscosidad superior aumentando su retención (Nebel et al., 1996).

3.- OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Puesta a punto de la encapsulación espermática en la especie canina.
2. Determinar el mejor protocolo de encapsulación en relación a la viabilidad espermática.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1. Material biológico

Como donantes de semen se han utilizado un total de 4 perros de raza Beagle de dos años de edad y calidad seminal contrastada, que no recibían ningún tratamiento ni padecían lesiones evidentes que pudiesen alterar su fertilidad. Han permanecido alojados en las instalaciones del SAEA de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

4.1.2. Material laboratorio

Se ha utilizado el material inventariable y fungible de uso habitual en un laboratorio de tecnología seminal.

4.2 Método

4.2.1 Preparación de medios

Antes de cada experimental, se prepararon todas las soluciones que vamos a usar.

- Preparación de los alginatos a diferentes concentraciones:

En la puesta a punto, se prepararon las diferentes concentraciones de alginatos en los medios base correspondientes, tal y como se refleja en la **tabla 2**.

Alginate	Alginate (gr)	Medio base (ml)
1% PBS	1	100 ml PBS
1.5% PBS	1.5	100 ml PBS
1% Solución salina (SS)	1	100 ml SS
1.5% Solución salina (SS)	1.5	100 ml SS
1% Andromed	1	100 ml Andromed
1.5% Andromed	1.5	100 ml Andromed

Tabla 2: preparación de los diferentes alginatos de la primera experiencia.

Para el segundo experimental, las preparaciones fueron las que se describen en la **tabla 3**.

Alginate	Alginate (gr)	Medio base (ml)
1% PBS	1	100 ml PBS
1.5% SS	1.5	100 ml SS
1% Canipro	1	100 ml Canipro Chill

Tabla 3: preparación de los diferentes alginatos en la segunda experiencia.

Finalmente, y en base a los resultados obtenidos en las experiencias anteriores, las preparaciones que se hicieron para el experimental definitivo quedan reflejadas en la **tabla 4**.

Alginate	Alginate (gr)	Medio base (ml)
1% Fiser (Fracción I, huevo)	1	100 ml Fiser (Fracción I, huevo)
1% Fiser (Fracción I, huevina)	1	100 ml Fiser (Fracción I, huevina)
1% PBS	1	100 ml Canipro Chill
1.5% SS	1,5	100 ml SS

Tabla 4: preparación de los diferentes alginatos en la experiencia definitiva.

Para que los alginatos se disolvieran, era necesario aplicar una agitación lenta a temperatura de 40°C.

En la **tabla 5** se refleja la composición del Diluyente Fiser (Fracción I) (Fiser et al, 1989):

Reactivo	Cantidad
Tris	8,15 g
*D-fructosa	12,3 g
Ácido cítrico anhídrido	4,25 g
Penicilina G sódica	0,07 g
Dihidrostreptomina	0,312 g
Yema de huevo o Huevina 25%	62,50 ml
Agua ultra pura	250 ml

Tabla 5. Composición Diluyente Fiser (Fracción I)

Los productos químicos, con su referencia, utilizados se detallan en el **anexo I**.

4.2.2. Extracción seminal

La extracción del semen se ha realizado utilizando la técnica manual, respetando el criterio de no superar un máximo de dos extracciones seminales por semana, y dejando un mínimo de un día entre éstas.

Para la extracción seminal, debemos disponer de:

- Tubos Falcon estériles de 15 ml previamente atemperados
- Soporte plástico de una vagina artificial (Imagen 3)
- Gasas
- Suero fisiológico estéril

Es recomendable hacer este procedimiento en un lugar en el que el donante esté tranquilo y relajado. En este sentido, las extracciones se han realizado siempre en el mismo lugar, para que los animales se sintieran seguros al reconocer la zona y no se inhibieran.

1. Se empieza tras limpiar la zona del pene con suero fisiológico estéril (Imagen 4).
2. A continuación, se retrae totalmente el prepucio hasta detrás de los bulbos (Imagen 5).
3. Mientras se mantiene en esta posición, se aplica una ligera presión constante, simulando la vagina de la perra.
4. Una vez completada la eyaculación, se retira el cono de látex. (Imagen 6)



Imagen 3



Imagen 4



Imagen 5



Imagen 6

4.2.3 Obtención de mezcla heterospérmica y mezcla con los diferentes alginatos

1. Una vez en el laboratorio, tras la contrastación seminal de cada uno de los eyaculados para garantizar una calidad mínima, éstos se diluyeron en Canipro (1:2).
2. Adicionado el Canipro, se unificaron los eyaculados para hacer la mezcla heterospérmica y se dividió el resultado en tanto tubos Falcon como soluciones de alginato se fueran a testar; de esta manera se puede adicionar sin necesidad de trasladar de nuevo el semen, minimizando así su manipulación.
3. Separadas las muestras, se procedió a su centrifugación (500g durante 5 minutos), para la eliminación del plasma seminal.
4. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante mediante pipetas Pasteur para quedarnos solo con el pellet.
5. Se comprueba la motilidad de la mezcla de semen con Canipro tras la centrifugación.
6. Se añaden las diferentes concentraciones de alginatos:

	Diluyentes	% de alginato
Puesta a punto	Andromed	0'5%, 0'75%, 1%, 1'5%
	PBS	0'5%, 0'75%, 1%, 1'5%
	SS	0'5%, 0'75%, 1%, 1'5%
Segunda experiencia	Canipro	1%
	PBS	1%
	SS	1'5%
Protocolo definitivo	Fiser ,Fracción I, huevo	1%
	Fiser ,Fracción I, huevina	1%
	PBS	1.5%
	SS	1%

4.2.4 Encapsulado seminal

Las cápsulas se hacen cargando las diferentes soluciones de alginato en una jeringuilla de insulina, conectada a una aguja de 21g. En este momento se van dejando caer las gotas sobre la primera solución del protocolo, a una distancia de unos 4cm. Las gotas se dejan caer sobre un pocillo de porcelana con orificios en su base, a modo de colador.

La primera solución es el cloruro cálcico al 1.5%, a continuación vendría la Poli-L Lisina 0.1% y terminando con citrato sódico 55 mM. Entre ellas, las cápsulas deben de ser lavadas en SS. Nuestro experimental plantea también los lavados en PBS, por ello cada una de las mezclas, llevará dos itinerarios: lavados con PBS una y lavados con SS otra.

Una vez hechas las cápsulas, éstas se mantendrán en sendas soluciones según la vía que hayan llevado en los lavados.

Para la realización de los diferentes pases, se prepararon bandejas de porcelana con las soluciones preparadas anteriormente con cloruro cálcico, Poly-L-lisina y citrato sódico, que son los tres pasos compartidos de cada línea. Se llenan al máximo para asegurarnos que al poner los pocillos que contienen las cápsulas, éstas queden totalmente sumergidas en las soluciones.

Finalmente, tras obtener las cápsulas, se valoró su mantenimiento en refrigeración y el tiempo que tardan en disgregarse tras someterlas a 37°C (simulación de las condiciones de la vagina de la perra).

El procedimiento detallado es el siguiente:

1. Cargar la muestra del semen junto con el correspondiente alginato en una jeringa de 1 ml conectada a una punta plástica modificada
2. Dejar caer con precisión gotas en los pocillos bañados en cloruro cálcico 1'5%. Esperar 1 minuto.
3. Hacer tres lavados en PBS o SSF.
4. Sumergir el pocillo en la Poly-L-lisina durante 5 minutos.
5. Lavar tres veces en PBS o SSF.
6. Sumergir el pocillo en citrato sódico 55mM durante 2 minutos.
7. Sumergir las cápsulas en la solución de lavado.
8. Coger las cápsulas mediante una micropipeta con la punta cortada y redondeada y conservarlas en pocillos de plástico identificados, la mitad para refrigerar y la otra mitad para baño a 37°C.
9. Cada pocillo contendrá una solución en la que se mantendrán las cápsulas, ya sea PBS, SS, Canipro o Fiser (Fracción I), dependiendo del itinerario que hayan seguido durante su formación.

4.2.5. Valoración y clasificación de las cápsulas

Las cápsulas mantenidas en pocillos a temperatura de refrigeración se valoran a las 24 horas.

Los parámetros que se tienen en cuenta son los siguientes:

- Conformación

Para poder clasificarlas, les asignamos un valor numérico basado en los siguientes criterios:

1	No hay presencia de cápsula ni de membrana capsular
2	Hay presencia de membrana capsular, sin contenido
3	Presencia de cápsula con bordes irregulares
4	Presencia de cápsula: forma algo irregular o heterogénea
5	Presencia de cápsula: forma esférica, homogénea, de tamaño “normal”

- Resistencia

1	No se pueden coger las cápsulas: por ausencia o porque se deshacen
2	Se deshacen antes de poner el cubre encima
3	Al poner el cubre encima se deshacen sin aplicar presión
4	Al presionarlas con el cubre, hay que aplicar un mínimo de presión
5	Al presionarlas fuerte con el cubre no se deshacen.

- Tiempo de resistencia en baño a 37°C.

Se calcula el tiempo que tardan en deshacerse las cápsulas a esta temperatura.

- Motilidad y vitalidad de los espermatozoides dentro de las cápsulas.

Para valorar la motilidad de los espermatozoides, se cogen 5 µl de líquido resultante de la disolución de la cápsula y se coloca en un portaobjetos, con el correspondiente cubreobjetos y se realiza el estudio de motilidad mediante sistema computerizado (Isas Proiser).

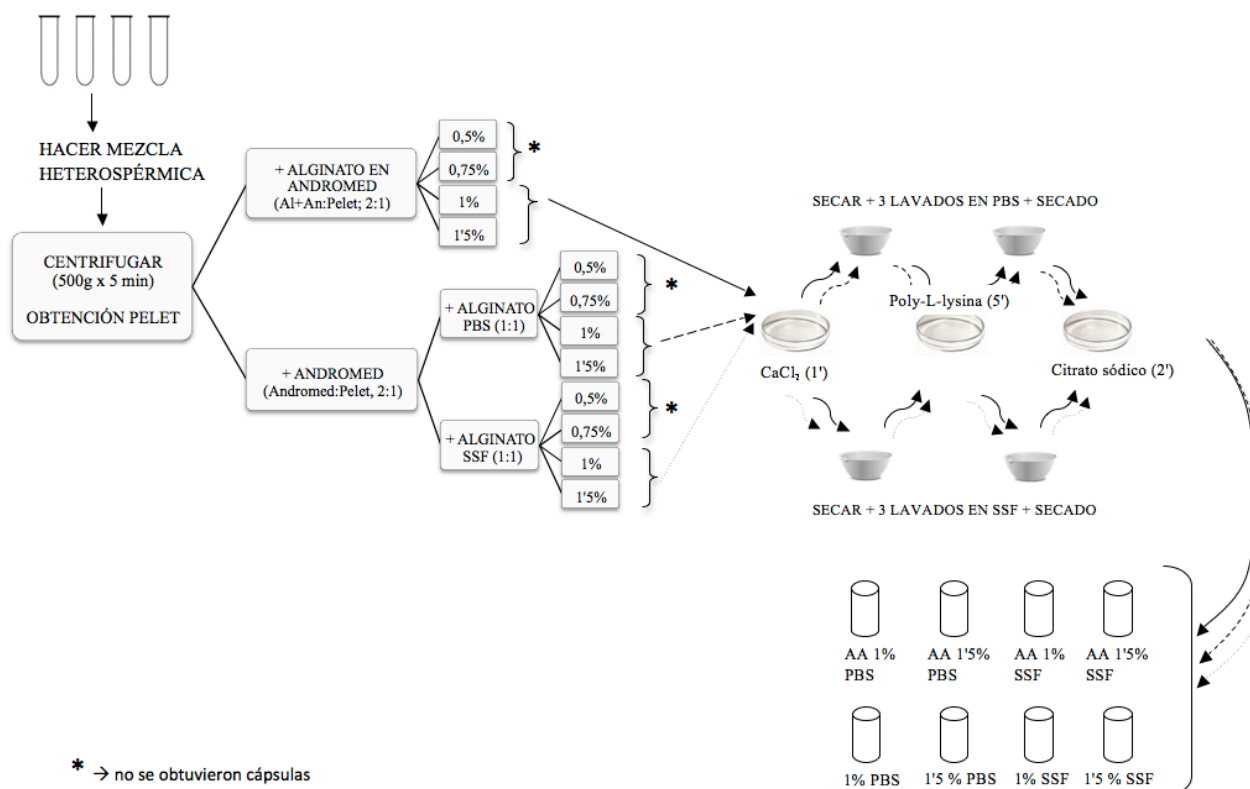
La vitalidad de los espermatozoides se obtiene con el porcentaje de vivos y muertos, mediante la tinción de eosina-nigrosina.

5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

La parte experimental de este trabajo se centró en la obtención de cápsulas con semen siguiendo varios protocolos, para determinar cuál era el que mejores resultados ofrecía. De esta manera hemos podido valorar al mismo tiempo diferentes variables: mezcla inicial, concentración de alginato, solución de lavado y medio de conservación; escogiendo así la mejor combinación.

Se realizaron numerosas pruebas para la puesta a punto del experimental antes de definir el protocolo definitivo. Inicialmente, y en base a trabajos previos del grupo, se trabajó con Andromed como medio base y diferentes concentraciones de alginatos: 0'5%, 0'75%, 1% y 1'5%. Las dos primeras concentraciones (0.5% y 0.75%) se descartaron al no observar formación de cápsulas tras tres repeticiones.

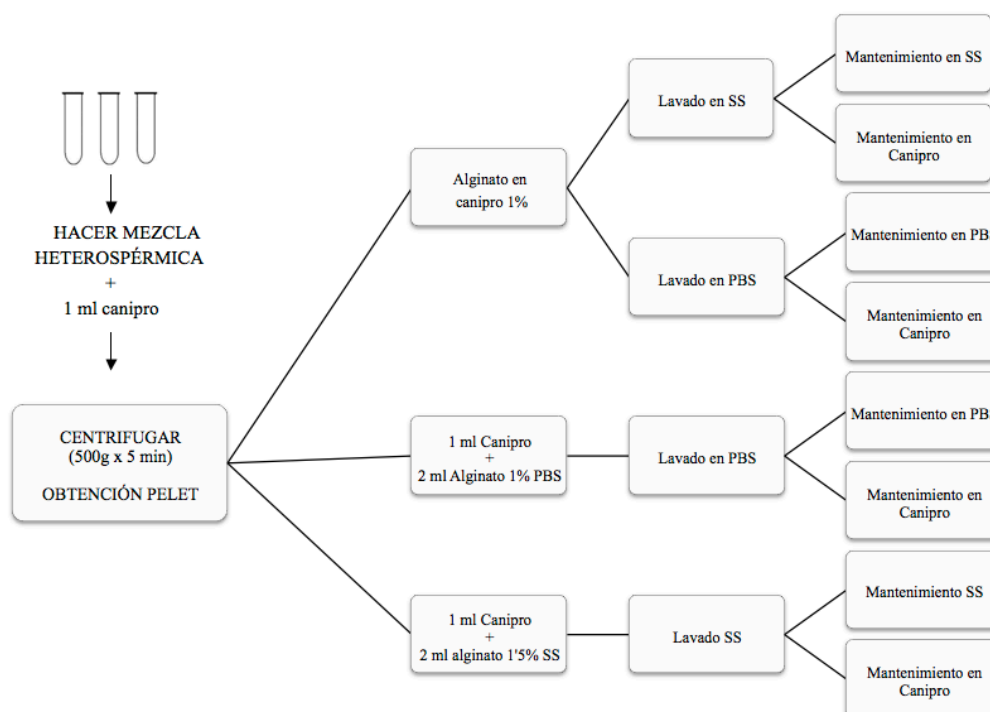
5.1 Puesta a punto del experimental



5.2. Descripción del protocolo del segundo experimental

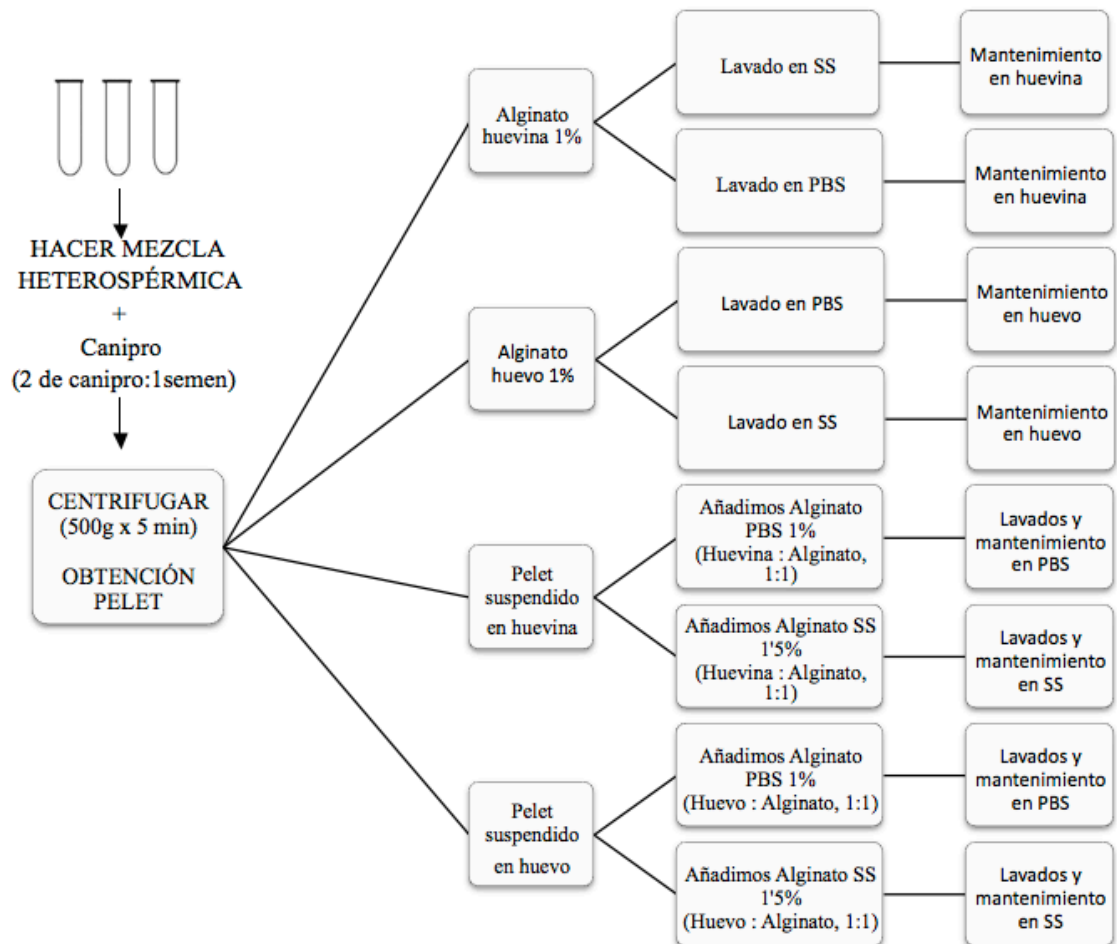
Valorando los resultados de las experiencias preliminares, se optó por seleccionar los que mejores resultados ofrecieron, para ir delimitando los medios a usar. Los seleccionados fueron: alginato 1% PBS y alginato 1'5% SS y solución de alginato (1%) sobre Canipro (2:1). En este último caso se consideró oportuno reemplazar en Andromed (diluyente bovino) por Canipro (diluyente canino)

El resto del protocolo a seguir fue el mismo indicado en el protocolo anterior.



5.3. Protocolo del experimental definitivo

Finalmente se hizo un último experimental, siguiendo con los alginatos al 1% en PBS y al 1.5% en SS, pero reemplazando esta vez el Canipro por la Fracción I del diluyente Fiser (diluyente ovino), adicionado (25%) bien con huevo o bien con huevina y manteniendo la concentración del alginato al 1%. Se consideró oportuno incorporar este cambio por la presencia de huevo y huevina de cara a la crioprotección de los espermatozoides.



6. RESULTADOS

A continuación se detallan las valoraciones obtenidas en cuanto a calidad de las cápsulas siguiendo los tres protocolos anteriormente descritos, con las respectivas experiencias de cada uno. No en todas las experiencias se registró la motilidad, en aquellas en las que sí se pudo registrar aparecerá reflejado en la correspondiente tabla y en los momentos en los que se evaluó.

6.1. Puesta a punto previa

Alginateo		Conformación	Conformación 24 h	Resistencia 24h	Motilidad 0h (%)	Motilidad 24h (%)
Andr 1% PBS	Prueba 1	1	-	1	-	-
	Prueba 2	1	-	-	0	-
	Prueba 3	3	2	1	60	50
	Media	1,66	2	1	30%	50%
Andr. 1'5% PBS	Prueba 1	2	-	4	-	-
	Prueba 2	4	-	-	0	-
	Prueba 3	3	2	1	1	23
	Media	3	2	2,5	0,50%	23%
Andr. 1% SS	Prueba 1	1	-	1	-	-
	Prueba 2	1	-	-	0	-
	Prueba 3	4	2	1	60	50
	Media	2	2	1	30%	50%
Andr. 1'5% SS	Prueba 1	4	-	3	-	-
	Prueba 2	2	-	-	0	-
	Prueba 3	4	2	1	1	23
	Media	3,33	2	2	0,50%	23%
PBS 1%	Prueba 1	3	-	2	-	-
	Prueba 2	4	-	-	50	-
	Prueba 3	3	3	1	80	42
	Media	3,33	3	1,5	65%	42%
PBS 1'5%	Prueba 1	2	-	3	-	-
	Prueba 2	4	-	-	55	-
	Prueba 3	3	2	2	80	42
	Media	3	2	2,5	67,50%	42%
SS 1%	Prueba 1	3	-	2	-	-
	Prueba 2	4	-	-	60	-
	Prueba 3	4	2	1	70	51
	Media	3,66	2	1,5	65%	51%
SS 1'5%	Prueba 1	2	-	3	-	-
	Prueba 2	4	-	-	60	-
	Prueba 3	5	3	1	70	50
	Media	3,66	3	2	65%	50%

El mantenimiento durante los 4 días se hizo en refrigeración a 4°C

Se observan unos valores más altos en motilidad cuando se añade el diluyente separadamente del alginato.

Si tenemos en cuenta cada línea realizada, se aprecian algunas diferencias según la concentración usada. En todos los casos la resistencia es mayor al emplear concentraciones de 1'5% que de 1%. También a mayores concentraciones, la conformación es mejor, con la excepción del alginato 1% PBS.

Por este motivo, al plantear un segundo experimental y querer continuar con las mejores líneas se seleccionaron: alginato 1'5% SS, alginato 1% PBS y Andromed+Alginato 1% por la motilidad observada en las pruebas de conservación

6.2. Resultados del segundo experimental

Previamente a la realización de las cápsulas, se valoró la motilidad de los espermatozoides en los diferentes medios con las distintas concentraciones de alginato, así como la viabilidad de los mismos, obteniéndose los siguientes resultados:

- Alginato canipro 1%: motilidad = 68% vitalidad = 83%
- Alginato SS 1%: motilidad = 44% vitalidad = 86%
- Alginato PBS 1.5%: motilidad = 65% vitalidad = 93%

La valoración de los alginatos el día de la segunda prueba también fue muy buena, superior al 95% en las tres preparaciones (SS, PBS y Canipro).

Se hizo en las demás pruebas, la valoración de la motilidad tras 24 horas:

Alginato		Motilidad
Alginato en canipro	Prueba 1	-
	Prueba 2	5%
	Prueba 3	20%
	Prueba 4	70%
	Media	31,67
Alginato SS 1'5%	Prueba 1	-
	Prueba 2	No mótils
	Prueba 3	34%
	Prueba 4	<5%
	Media	<20%
Alginato PBS 1%	Prueba 1	-
	Prueba 2	No mótils
	Prueba 3	19%
	Prueba 4	<10%
	Media	<15%

Haciendo la media de las tres datos de motilidad de los diferentes alginatos a las 24 horas, se aprecia un valor superior en el alginato en Canipro al 1%.

Los valores que se obtuvieron en relación a la conformación, resistencia y motilidad llevando a cabo este protocolo son los siguientes:

Alginato		Conformación 24 h	Resistencia 24h	Motilidad 24h (%)	Puntuación cápsula
AC por SS (SS)	Prueba 1	1	1	No mótils	
	Prueba 2	1	1	-	
	Prueba 3	2	2	No mótils	
	Prueba 4	2	2	<5%	
	Media	1,5	1,5	<5%	3
AC por SS (C)	Prueba 1	2	2	<15%	
	Prueba 2	2	2	-	
	Prueba 3	2	2	<5%	
	Prueba 4	2	2	<5%	
	Media	2	2	<10%	4
AC por PBC (PBS)	Prueba 1	2	2	<15%	
	Prueba 2	1	1	-	
	Prueba 3	2	2	No mótils	
	Prueba 4	3	2	No mótils	
	Media	2	1,75	<5%	3,75
AC por PBS (C)	Prueba 1	2	2	<10%	
	Prueba 2	1	1	-	
	Prueba 3	2	2	10%	
	Prueba 4	2	2	<5%	
	Media	1,75	1,75	<10%	3,5
SS 1'5% (SS)	Prueba 1	3	2	No mótils	
	Prueba 2	2	2	-	
	Prueba 3	2	2	10%	
	Prueba 4	2	2	<10%	
	Media	2,25	2	<10%	4,25
SS 1'5% (C)	Prueba 1	2	2	>50%	
	Prueba 2	1	1	-	
	Prueba 3	3	2	70%	
	Prueba 4	2	2	<10%	
	Media	2	1,75	<50%	3,75
PBS 1% (PBS)	Prueba 1	3	2	>50%	
	Prueba 2	1	1	-	
	Prueba 3	2	2	No mótils	
	Prueba 4	3	3	5%	
	Media	2,25	2	<20%	4,25
PBS 1% (C)	Prueba 1	3	2	>50%	
	Prueba 2	2	1	-	
	Prueba 3	3	2	70%	
	Prueba 4	2	2	5%	
	Media	2,5	1,75	<50%	4,25

En aquellos casos que permanecía la cápsula, los espermatozoides que se encontraban adheridos en ella eran los que presentaban motilidad.

En este segundo experimental, se confirma de nuevo que la conformación presentada en las cápsulas formadas con la mezcla de alginato + Canipro son peores que aquellas que se preparan primero añadiendo el Canipro y después el alginato.

Dentro de este segundo grupo, se ve que cuando las cápsulas se mantienen en PBS o SS, la cápsula tiene mayor conformación y resistencia, pero menor motilidad; sucede al contrario si son mantenidas en Canipro.

6.3. Resultados del experimental definitivo

Alginato		Conformación	Resistencia	Motilidad	Puntuación cápsula 24h
Huevo + Alg SS 1'5%	Prueba 1 (24h)	5	4	Azoospermia (0)	
(Cons: SS)	Prueba 2 (24h)	5	5	No mótils (-)	
	Media (24h)	5	4,5	0/-	9,5
	Prueba 2 (48h)	5	4	No mótils (-)	
Huevina + Alg SS 1'5%	Prueba 1 (24h)	5	4	Azoospermia (0)	
(Cons: SS)	Prueba 2 (24h)	5	4	Mótils (+)	
	Media (24h)	5	4	0/+	9
	Prueba 2 (48h)	5	4	<5%	
Huevo + Alg PBS 1%	Prueba 1 (24h)	5	4	Azoospermia (0)	
(Cons: PBS)	Prueba 2 (24h)	5	5	No mótils (-)	
	Media (24h)	5	4,5	0/-	9,5
	Prueba 2 (48h)	5	4	No mótils (-)	
Huevina + Alg PBS 1%	Prueba 1 (24h)	5	4	No mótils (-)	
(Cons: PBS)	Prueba 2 (24h)	5	4	Mótils (+)	
	Media (24h)	5	4	-/+	9
	Prueba 2 (48h)	5	4	No mótils (-)	
Alg Huevina 1% vía PBS	Prueba 1 (24h)	3	4	No mótils (-)	
(Cons: Huevina)	Prueba 2 (24h)	5	4-	Mótils (+)	
	Media (24h)	4	4-	-/+	8
	Prueba 2 (48h)	5	4	21%	
Alg Huevina 1% vía SS	Prueba 1 (24h)	4	4	Mótils (+)	
(Cons: Huevina)	Prueba 2 (24h)	5	4-	Mótils (+)	
	Media (24h)	4,5	4-	+	8,5
	Prueba 2 (48h)	1	1	<10%	
Alg Huevo 1% vía PBS	Prueba 1 (24h)	5	4	No mótils (-)	
(Cons: Huevo)	Prueba 2 (24h)	5	4-	Mótils (+)	
	Media (24h)	5	4-	-/+	9
	Prueba 2 (48h)	5	4	37%	
Alg Huevo 1% vía SS	Prueba 1 (24h)	3	4	Mótils (+)	
(Cons: Huevo)	Prueba 2 (24h)	5	4-	Mótils (+)	
	Media (24h)	4	4-	+	8
	Prueba 2 (48h)	1	1	16%	

La conformación y la resistencia mostradas siguiendo el protocolo definitivo son óptimas en aquellas líneas en las que se parte de alginato PBS 1% o alginato SS 1'5%.

El mantenimiento de la motilidad es superior al conservar las cápsulas en huevo o huevina.

Valoración de los alginatos:

- Tras permanecer media hora a 37°C: las cápsulas se presentan disgregadas y no hay espermatozoides vivos en una ninguna de las preparaciones.
- Vitalidad en los alginatos (0h): En todas las diferentes preparaciones de los alginatos, los espermatozoides se presentan vitales.
- Vitalidad en los alginatos a las 48h:

Alginato	Motilidad	Alginato	Motilidad	Alginato	Motilidad
Huevo + alginato	No	PBS Al + huevina	Sí, lentos	SS Al + huevina	No
Huevina + alginato	Sí	PBS Al + huevina	Sí, lentos	SS Al + huevo	No

- A las 24 horas, los alginatos presentaban una motilidad del **15-20%** clasificados lentos por el analizador computarizado de semen (Isas Proiser).

6.4. Discusión

La encapsulación de semen en la especie canina, es un método de conservación poco estudiado a día de hoy, habiendo solo publicados dos artículos por el momento por Shah (2009, 2010).

En este trabajo se quiso valorar qué alginato formaba mejores cápsulas y a qué concentración, pero sobre todo teniendo en cuenta la motilidad posterior de los espermatozoides, cuyo mantenimiento es el objetivo del proceso.

Las cápsulas no mantuvieron una buena conformación y/o resistencia tras ser mantenidas en refrigeración 24 horas hasta que no se siguió el tercer protocolo. Es decir, en las primeras experiencias se encontraban solo las paredes de la cápsula (sin contenido) o una cápsula completamente disuelta. No se han apreciado incrementos de tamaño de la cápsula, a diferencia de lo presentado en el estudio de Shah *et al.* (2009).

Para valorar a los espermatozoides, el parámetro contemplado ha sido la motilidad. En el primer experimental no hay datos suficientes para valorar la diferencia de motilidad entre el semen encapsulado y el no encapsulado (que serían los alginatos). De todas maneras, se llega a la misma conclusión que Shah (2009), cuando se refiere a que la concentración de alginato requerida para que se formen las cápsulas debe ser superior a 1%.

En el segundo, al fijarnos en los valores de motilidad, se muestran variaciones según si se añaden juntos el alginato y Canipro o si se hace en dos tiempos. De todas maneras, en términos generales, la motilidad de los encapsulados es menor que en los no encapsulados.

Las valoraciones recogidas del último experimental, sí que se aprecia una mayor motilidad en los espermatozoides encapsulados respecto a los no encapsulados en aquellos que se

mantuvieron en el diluyente Fiser (Fracción 1), como Shah en 2010 cuando expuso la cápsulas a glicerol durante 1 hora a 4°C. Tanto nosotros como Shah (2010) los resultados mejoraron al utilizar un crioprotector, adicionado en el diluyente de conservación de las capsulas (glicerol y huevo ó huevina) que le protegen de la temperatura de refrigeración.

7.- CONCLUSIONES

Con los resultados de nuestro experimental, podemos concluir, tras realizar los diferentes protocolos que:

- Los alginatos sódicos disueltos en PBS ó SS y adicionados a los distintos diluyentes forman esferas consistentes, pero no mantienen la viabilidad espermática.
- El diluyente de Fiser (Fracción I) con huevo o huevina, al que se le adiciona alginato sódico al 1%, permite formar capsulas de gran consistencia que mantienen los espermatozoides viables.
- El mantenimiento de la viabilidad espermática tras la encapsulación sólo es posible si se mantienen con un crioprotector (huevo o huevina).

La realización de esta puesta a punto, define y aporta datos que sirven para perfeccionar la que puede llegar a ser una técnica de inseminación con una sola dosis.

CONCLUSIONS

With our experimental results, we can conclude, after making the different protocols:

- The sodium alginates dissolve in PBS or SS and added to the various diluents form consistent sphere, but do not maintain sperm viability.
- Fiser Diluent (Fraction I) egg or egg substitute, to which is added 1% sodium alginate, can form high consistent spheres maintaining viable sperm.
- The maintenance of sperm viability after encapsulation is only possible if it stays with a cryoprotectant (egg or egg substitute).

Performing this setup, it defines and provides data used to refine that may become a technique of insemination with a single dose.

8. VALORACIÓN PERSONAL

La realización del trabajo de fin de grado personalmente me parece una buena manera de finalizar los estudios. El hecho de ampliar los conocimientos sobre un tema que escogí y poder estar en el departamento investigando sobre ello, me ha enriquecido. Además, al realizar un trabajo experimental, he aprendido que se tiene que tener paciencia, voluntad y un poco de imaginación en el mundo de la investigación para conseguir, tarde o temprano, los resultados esperados. Cabe decir que la valoración positiva de esta experiencia se debe en gran parte a la Unidad de Reproducción, concretamente a la futura doctora Maite Olaciregui y a mis directoras, Dra. Noelia González y Dra. Lydia Gil.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa, A. (2000). Microcápsulas: uma alternativa viável [en línea]. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* (16)., pp. 26-30.

Boh, B. y Sumiga, B. (2008). Microencapsulation technology and its applications in building construction materials. *RMZ – Materials and Geoenvironment*, 55(3), 329-344.

Chan, E.-S., Lee, B.-B., Ravindra, P., y Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338(1), 63-72.

Concannon P.W., England G., Verstegen III J. and Linde-Forsberg C. (2006) Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service, Ithaca NY A1234.0406.ES

England G.C.W; Ponzio (1996). Comparasion of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46:165-171.

Feldman E, Nelson R (2007). *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Ed. Inter-médica, Buenos Aires, pp: 1038-1134.

Fiser, P.S.; Fairfull, R.W (1989):The effect of glycerol-related osmotic changes on post thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26 (1) 64-9

Ghidoni, I.; Chlapanidas, T.; Bucco, M.; Crovato, F.; Marazzi, M.; Vigo, D.; Torre, M.; Faustini, M. (2008). Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology*. 58(1), 49-56

Hernández et al (2012) Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. Vol. XIII, Núm. 2, 2012, 155-168

Hinestroza-Córdoba (2008). Técnicas de encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 2: 28-35

Johnston S, Kustritz M, Olson P (2001). *Canine and feline theriogenology*. Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 1-104, 275-306

Kreeger, P.; Fernandes, N.; Woodruff, T.; Shea, L. (2005). Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol. Reprod.* 73(5), 942-50

Lim F, Sun AM. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 210: 908-910.

López-Córdoba A. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. Tesis doctoral en Tecnología e Higiene de los alimentos (Universidad Nacional de la Plata).

Marshall F., Hugh A. (1990) *Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction*. Ed Churchill Livingstone. New York (United States); 27: 769-775.

Nebel RL, Vishwanath R, McMillan WH, Saacke RG (1993) Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: a review. *Reprod Fertil Dev* 5:701–712

Nebel RL, Vishwanath R, McMillan WH, Pitt CJ. (1996). Microencapsulation of bovine spermatozoa viability and fertility. *Anim Reprod Sci* 44(2): 79-89.

Peña, A. & Linde-Forsberg, C (2000). Effects of Equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54:859-75,.

Peña FJ, Núñez-Martínez I; Morán JM (2006). Semen technologies in dog breeding: an update. *Repro. Dom. Anim.*, 41 (2), 21-29.

Petrunkina A-M, Simon K, Günzel-Apel, R.; Van der Gaag, I.; Van Sluijs FJ (2000). Spermatogenesis and testicular tumors in ageing dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 120 (2): 443-452.

Rathore, S.; DESAI, P.; Liew, C.; Chan, L.; Heng, P. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *J. Food Eng.* 116(2), 369- 381.

Röpke, T.; Oldenhof, H.; Leiding, C.; Sieme, H.; Bollwein, H.; Wolkers, W. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*. 76(8), 1465-1472.

Root Kustritz, MV. (2005) *Manual de reproducción del perro y del gato*. Ed. Multimédisa Ediciones Veterinarias, pp: 203.

Sánchez-Sánchez R. (2014) Semen encapsulado de porcino: conservación seminal, cinética de liberación, transporte espermático, y resultados en granja. *MAYO de 2015 Volumen XXXII N° 325 ISSN 1852-317X*

Sánchez-Sánchez, R., Morell-Bras, J., Llamas López, P.J., González-Bulnes, A., De la Cruz-Vigo, P., Martín Lluch, M., Carrascosa-Roldán, C., Gómez-Fidalgo, E. (2014). Encapsulación de semen de

verraco (II). Resultados obtenidos en conservación seminal, transporte espermático y pruebas de inseminación. *Avances en Tecnología Porcina*, 108: 50-58

Sato K., Yoshida K., Takahashi S., Anzai J.I. (2011). pH- and sugar-sensitive layerby-layer films and microcapsules for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 809-821.

Shah, S.; Nagano, M.; Yamashita, Y.; Hishinuma, M. (2009). Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C. *Theriogenology*. 73(5), 560-567.

Shah, S.; Tsubasa O.; Chika F.; Naoki Y.; Yasuhisa Y.; Shogo H.; Mitsugu H. (2010). Cryopreservation of microencapsulated canine sperm. *Theriogenology* 75, 679-686.

Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM (2006). Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Repro. Dom. Anim.*, 41:74-78.

Stornelli MA, De La Sota RL (2006) Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*, 25 (2): 29-38

Torre ML, Munari E, Albani E, Levi-Setti PE, Villani S, Faustini M, Conte U, Vigo D (2006) In vitro maturation of human oocytes in a follicle-mimicking three-dimensional coculture.

Valenzuela, C, Hernández V, Rodríguez F, Carrillo R. (2015) Tecnología de Encapsulación y su Aplicación en Ciencias Veterinarias. *Avances en Ciencias Veterinarias V28 N°2*, 58-75.

Weber, W.; Rimann, M.; Schafroth, T.; Witschi, U.; Fussenegger, M. (2006). Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. *J. Biotechnol.* 123(2), 155-163.

ANEXO I: Productos químicos utilizados en el experimental

Para la preparación de los medios son de SIGMA, si no se especifica lo contrario, y son los siguientes:

Producto	Referencia
Cloruro cálcico	1023911000 (Panreac®)
Citrato sódico	54641
Alginato	A0682
PBS	D4031
SS	343986 (Braun®)
Andromed	13503/0200 (Minitube®)
Poly-L-Lysina	P8920
Canipro	13700/0030 (Minitube®)
TRIS	T-1378
D-fructosa	F-0127
Ácido cítrico anhídrido	C0759
Penicilina G sódica	PEN -NA
Dihidrostreptomicina	D7253
Yema de huevo o Huevina 25%	
Agua ultra pura	

ANEXO II: Imágenes de los distintos experimentales.



Imagen 1:

Experimental 1. Valoración de la resistencia a 37°C de las cápsulas.



Imagen 2:

Experimental 1. Valoración de la conformación de las cápsulas.

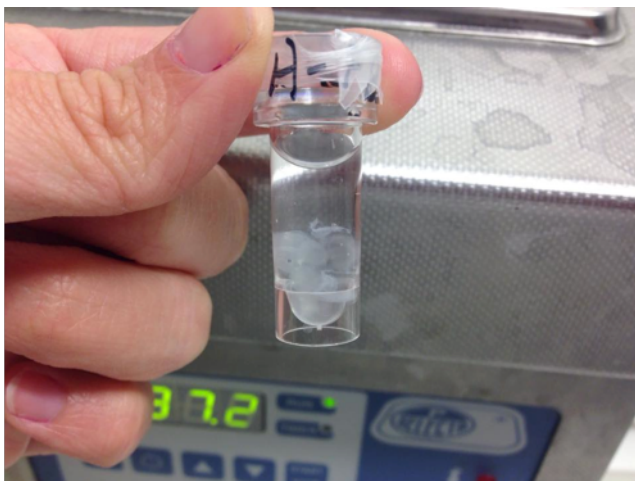


Imagen 3:

Experimental 1. Cápsulas de Andromed + Alginato de PBS 1%. Conformación = 3.



Imagen 4:

Experimental 2: Preparación del material del laboratorio.

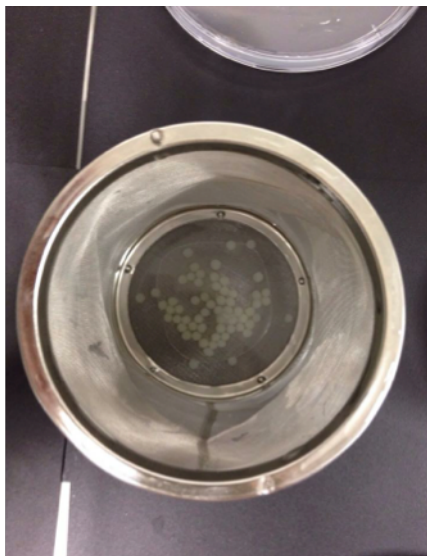


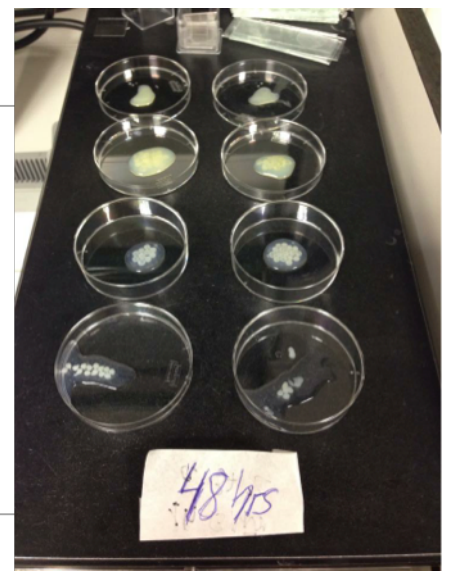
Imagen 5:

Experimental 3: Vista de las cápsulas formadas dentro del filtro usado para hacer pasar las cápsulas por las distintas soluciones.

Imagen 6:

Experimental 3. Valoración de las cápsulas tras ser conservadas durante 48 horas en refrigeración a 4°C. La colocación es:

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| • Alginato huevo 1% vía SS | • Alginato huevina 1% vía SS |
| • Alginato huevo 1% vía PBS | • Alginato huevina 1% vía PBS |
| • Huevo + Alginato SS 1'5% | • Huevina + Alginato SS 1'5% |
| • Huevo + Alginato PBS 1% | • Huevina + Alginato PBS 1% |



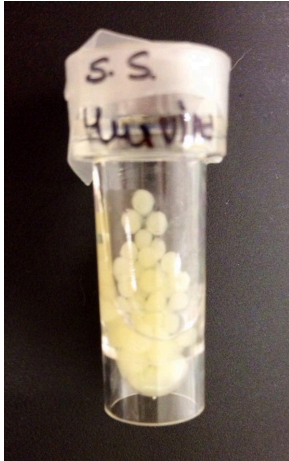


Imagen 7:

Experimental 3. Cápsulas de
huevo + alginato de SS 1'5%
formadas almacenadas en pocillo.
Conformación = 5.